

***Horka^D*, a *Drosophila* kromoszóma
instabilitást okozó mutációja a *lodestar* gént
azonosítja, és arra utal, hogy a Lodestar
fehérje a metafázisú kromoszómák
„felügyeletében” játszik szerepet**

Ph.D. értekezés tézisei

Szalontai Tamás



Biokémia, Biofizika és Sejtbiológia doktori program

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

Szakvezető: Szabad János

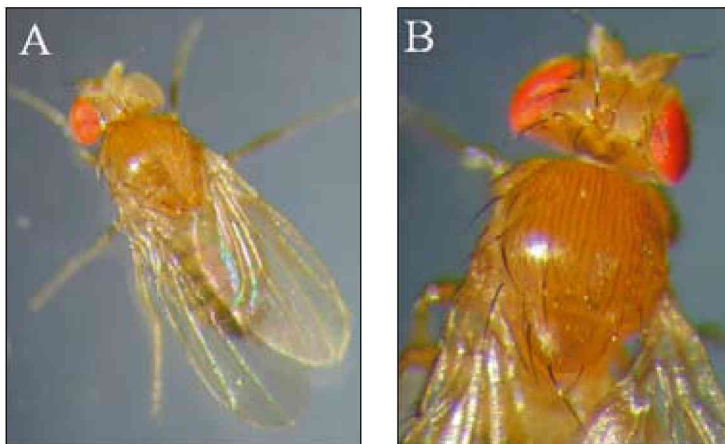
Szeged, 2008.

BEVEZETÉS

A „Szabad-műhely” munkatársai - előbb az MTA Szegedi Biológiai Központjának Genetikai Intézetében, majd a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Biológiai Intézetében - azt a kérdést remélik megérteni, hogy miért indul fejlődésnek egy megtermékenyült petesejt, miért kezdődik el az embriogenezis. A kérdést az ún. genetikai boncolás módszerével remélik megválaszolni. Úgy, hogy az immáron 102 éves modellfaj, a muslica (*Drosophila melanogaster*) olyan, ún. domináns nőstény-steril (*Fs*) mutációit indukálták, amelyek bár megengedik a látszólag ép peték képződését és megtermékenyülését, ám a petékben vagy el sem kezdődik az embriogenezis, vagy néhány kezdeti, és abnormális lépés után elakad (Erdélyi and Szabad 1989; Szabad et al. 1989). Amennyiben az *Fs* mutáció domináns negatív természetű - vagyis az ép és az *Fs* allél terméke úgy vesz részt ugyanabban a folyamatban, hogy a mutáns géntermék akadályozza az ép funkcióját -, kijelenthető, hogy az ép gén termékének van szerepe az embriogenezis elkezdődésében.

Horka^D (a továbbiakban *Horka^D*) a domináns nőstény-steril mutációk egyike (Erdélyi and Szabad 1989). Bizonyosan funkciónyeréses típusú, hisz' második mutagenesis során revertáltatható: a funkciónyeréses *Horka^D* allél funkcióvesztéses, ún. *horka^r* revertáns alléllá „alakítható” (Erdélyi and Szabad 1989). *Horka^D*-ről az évek során két további érdekesség is kiderült. (1) A spermatogenesis folyamán nagy gyakorisággal indukál nondisjunkciót, és (2) úgy teszi instabillá a kromoszómákat, hogy azok - domináns apai hatás révén - elveszhetnek az utód embriókban (Szabad et al. 1995).

A kromoszómák instabilitása révén diplo//haplo mozaikok képződnek, köztük az $XX/X0$, nős-tény//hím mozaikok, a gūnanderek is (1. ábra). Sőt, *Horka^D*-t eszközként használják gūnanderek generálására.



1. ábra. Egy *Horka^D*-vel generált gūnander (A), valamint egy haplo-4 mozaik (B) *Drosophila* képe. (A) A gūnander baloldala nőtény (XX), és nem mutatja az X kromoszómával kapcsolt recesszív marker mutációk fenotípusát. A *Horka^D* hímtől származó X kromoszóma elvesztése nyomán (amely az embrió-genezis korai szakaszában következik be), az $X0$ hím sejtekben megnyilvánul-hat az X kromoszómával kapcsolt recesszív marker mutációk fenotípusa: *w* (fehér szemek) és *y* (sárga test). (Lásd *Nature Genetics* **38**, 613, 2006.) Az XX és az $X0$ területeket elválasztó vonal lefutása véletlenszerű. (B) Amíg a szőrök normális méretűek a baloldalon, kicsik és vékonyak a haplo-4 mozaik jobboldalán. A baloldali sejtek két, a jobboldaliak csupán egy 4. kromoszómát tartalmaznak. A jobboldali sejtek egy *Minute* mutáció fenotípusát mutatják, amely a gén haplo-elégtelen állapotával kapcsolatos.

A *Horka^D*-vel kapcsolatos mutáns fenotípusok alapján arra lehetett következtetni, hogy az ép génnek szerepe van a kromoszómák integritásában és/vagy szegregációjában a sejtosztódások során. Az érdekes mutáns fenotípus motiválta munkámat, a *Horka^D*-vel azonosított ép gén szerepének molekuláris szintű megismerését.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám céljai, pontokba szedve, a következők voltak.

1. Duplikációs térképezéssel (i) állapítsuk meg $Horka^D$ pontos helyét, és döntsük el, hogy (ii) hogy $Horka^D$ antimorf (domináns negatív), vagy neomorf természetű.
2. Amennyiben $Horka^D$ domináns negatív természetű, jellemezzük a mutáns fenotípust, és következtessünk az ép gén lehetséges funkciójára.
3. Amennyiben $Horka^D$ domináns negatív természetű, citoplazma injekciókkal igazoljuk vélekedésünk igazát.
4. Amennyiben $Horka^D$ domináns negatív természetű, P-elemmel mutagenizálva indukáljuk a funkcióvesztéses típusú revertáns alléljait, és jelöljük azokat $horka^{rp}$ -vel.
5. A $horka^{rp}$ allélokból kiindulva
 - (i)deficienciákkal, valamint megjelölt P-elem próbával végzett *in situ* hibridizációk során határozzuk meg a $Horka^D$ -vel és a $horka^{rp}$ allélokkal azonosított ép gén helyét.
 - (ii) Jellemezzük a funkcióvesztéses mutáns allélokkal kapcsolatos fenotípust, és következtessünk az ép gén funkciójára.
 - (iii)Molekulárisan klónozzuk meg a gént (az ún. inverz PCR technika alkalmazásával).
6. Komplementációs analízissel derítsük ki, hogy $Horka^D$ és a $horka^{rp}$ allélok eddig ismeretlen, vagy már ismert gént azonosítanak.

7. Az ép gént, illetve a *Horka^D*-t tartalmazó transzgénekkel igazoljuk munkánk helyességét: valóban azt a gént klónoztuk meg, amelyet *Horka^D* és a *horka^{rP}* allélok azonosítanak.
8. Határozzuk meg, hogy milyen mutáció nyomán képződött *Horka^D*. A mutáció természete alapján határozzuk meg a mutáns fenotípusok eredetének alapját.
9. Készítsünk olyan transzgéneket, amelyek CFP-vel (vagy RFP-vel) jelölt ép, valamint *Horka^D*-kódolt mutáns fehérjék képződését kódolják, és kövessük nyomon - konfokális mikroszkópban készített optikai metszetek sorozatával az ép, valamint a mutáns fehérje molekulák életét a *Drosophila* embriógenézise során.
10. Az ép, valamint a mutáns fehérjék ismeretében határozzuk meg az ép gén funkcióját az embriógenézis elkezdődésében, lefolyásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

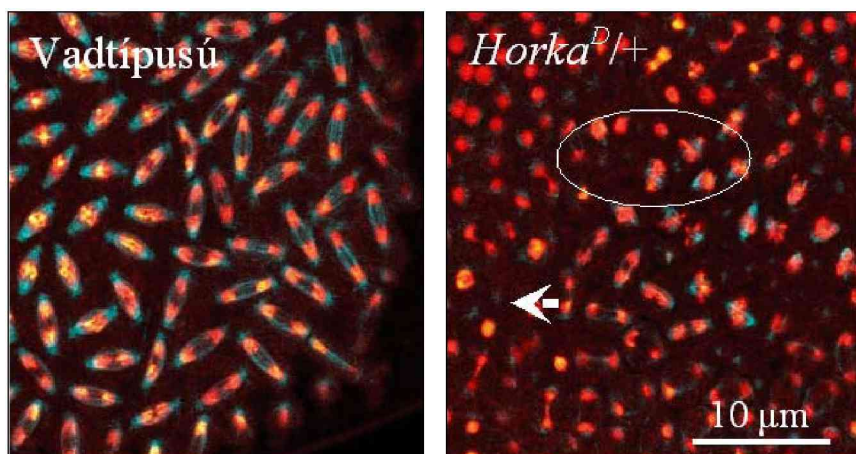
Kísérletes munkám pillére a muslica (*Drosophila melanogaster*) volt, nagyszerűen kidolgozott genetikájával, sejt- és fejlődésgenetikájával. Az alkalmazott molekuláris biológia technikák is a megszokottak voltak. A sejtbiológiai munkákban nagy segítségünkre volt a konfokális mikroszkóp, és a mikroinjekciós berendezés, amelyek mindennapos elfoglaltságot jelentettek. Eredményeim végeredményben a genetika, a molekuláris-, a sejt és a fejlődésbiológia tárházának használata nyomán születtek.

EREDMÉNYEK

Munkám legfontosabb eredményei, pontokba szedve, a következők (Szalontai et al. 2008).

1. Duplikációs térképezéssel megállapítottuk, hogy (i) *Horka^D* a harmadik kromoszóma jobb karján, a 84D5-8 - 85F5-8 közötti szakaszban van. (ii) Minthogy a *Horka^D/+/+* nőtények embrióiban a mutáns fenotípus erőssége csökkent, sőt tőlük néhány utód is származott megállapítottuk, hogy *Horka^D* domináns negatív típusú mutáció, alkalmas a további vizsgálatokra.
2. A *Horka^D* mutáns fenotípus jellemzése során kiderült, hogy *Horka^D* áldatlan hatása nyomán a kromoszómák szerveződése, valamint szegregációja sérült, a meiotikus, valamint az embrionális osztódások folyamán. A mutáns fenotípus alapján arra következtettünk, hogy a *Horka^D*-vel azonosított ép génnek a kromoszómák szerveződésében, és/vagy a sejtosztódások normális lefolyásában van szerepe. Azt gondoltuk, hogy *Horka^D*-ből kiindulva a kromoszómák szerveződésének és szegregációjának eddig ismeretlen jellegzetességeit ismerhetjük meg.
3. Miután *Horka^D/+* nőtények petéiből egy kevéske citoplazmát vad típusú embriókba injektáltuk kiderült, hogy a mutáns peték citoplazmája mérgező, és nagy gyakorisággal indukálja kromoszóma hidak képződését, abnormális sejtosztódásokat (2. ábra).

4. Miután kiderült, hogy *Horka^D* domináns negatív természetű, P-elemmel mutagenizáltuk, hogy *horka^{RP}* revertáns allélokat indukáljunk, izoláljunk. A 15.600 megvizsgált kromoszóma közül kilenc hordozott *horka^{RP}* allélt. A *horka^{RP}* allélok egyike, a *horka^{RP2}* amint arra később fényt derítettünk, teljes funkcióvesztést eredményező, ún. null allél.



2. ábra. A citoplazma injekciók hatása a szinciciális osztódásokra. Amíg a vad típusú citoplazma injekciója nem befolyásolja az osztódásokat, addig a *Horka^{D/+}* nőstények petéinek citoplazmája kromoszóma hidak képződését (←), és abnormális osztódásokat (O) indukál. Az injektált embriókban a kromoszómákat vörösen fluoreszkáló hiszton-RFP, a mikrotubulusokat zölden fluoreszkáló tubulin-GFP „világította ki”. A képek az élő embriókon, konfokális mikroszkóppal készített optikai metszetek sorozatából mutatnak kettőt.

5. A *horka^{RP}* allélokból kiindulva

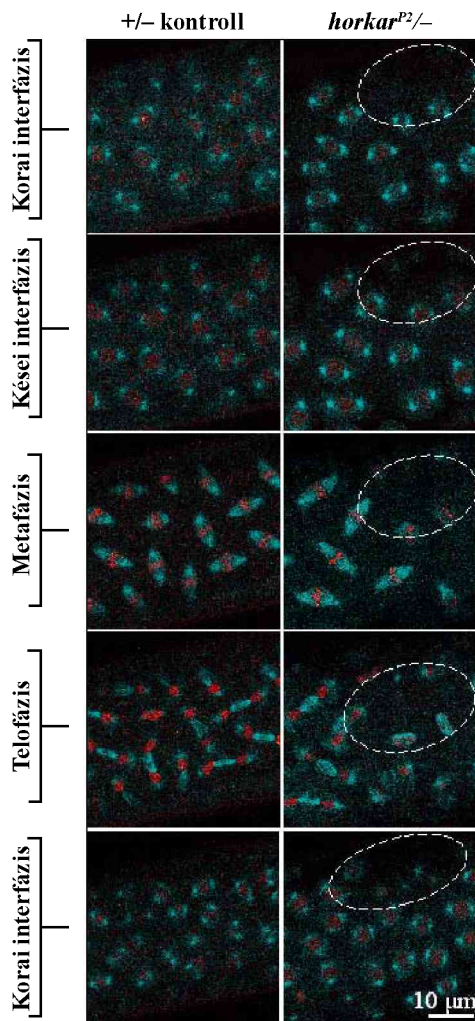
- (i) deficienciákkal, valamint P-elem próbával végzett *in situ* hibridizációk során kiderítettük, hogy a *Horka^D*-vel és a *horka^{RP}* allélokkal azonosított ép gén a 84E citológiai régióban van.

(ii) A *horka*^{rP2}/– hemizigóta nőtények, illetve embrióik vizsgálatával megmutattuk, hogy a *Horka*^D-vel és a *horka*^{rP} allélokkal azonosított ép gén funkciójának hiányában a meiotikus osztódások abnormálisak, jelezve, hogy az ép génnek fontos szerepe van a meiotikus osztódásokban. A *horka*^{rP2}/– hemizigóta nőtények embrióiban az ún. mitotikus kataszrófa jellegzetes tünetei alakulnak ki (3. ábra).

(iii) Molekulárisan klónoztuk - az ún. inverz PCR technika alkalmazásával - a *Horka*^D-vel és a *horka*^{rP} allélokkal azonosított ép gént. Kiderült, hogy a gén már ismert, és korábban a *lodestar* (*lds*) nevet kapta (Girdham and Glover 1991).

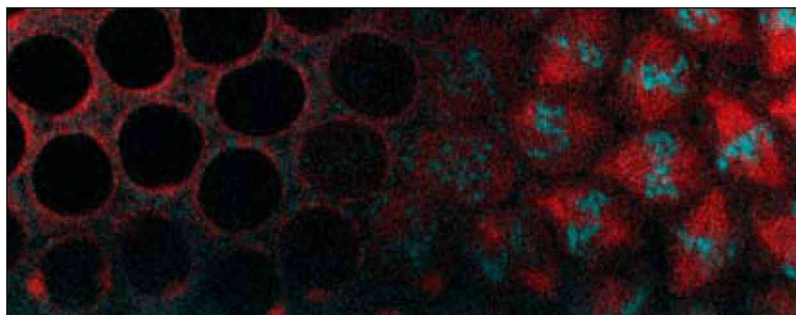
6. Az *lds* és a *horka*^{rP} allélok komplementációs analízise megmutatta, hogy a *Horka*^D és a *horka*^{rP} allélok valóban az *lds* gént azonosítják: a *horka*^{rP} és az *lds* mutáns allélok nem komplementálódnak.

7. Az ép *lds*⁺ gént tartalmazó transzgéneket készítettünk, és megmutattuk, hogy azok (i) kiküszöbölik a funkcióvesztéses allélokkal kapcsolatos defektusokat, és (ii) csökkentik a *Horka*^D-vel kapcsolatos abnormalitások mértékét. Azok a transzgének, amelyek *Horka*^D-t tartalmaznak (i) domináns nőtény-sterilitást indukálnak, és (ii) a spermatogenezis során a kromoszómákat instabillá téve gúnderek képződését eredményezik.



3. ábra. A *horkar*^{P2/-} nőstények embrióiban olyan rendellenességek alakulnak ki, amelyek a „mitotikus katasztrófa” jellegzetes ismérvei: olyan centroszómák képződnek, amelyek nem nukleálnak sem asztrális, sem pedig kinetochor mikrotubulusokat. A mikrotubulusok hiánya abnormalis osztódásokhoz vezet, és végeredményben ahhoz, hogy azok a sejtmagok a pete citoplazma mélyébe süllyednek, amelyek genetikai állománya tökéletlen. Mindeközben a centroszómák a pete kérgi részében maradnak, és további rendellenességeket okozhatnak az elkövetkező magosztódások folyamán. Az optikai metszetek olyan élő embriókon készültek, amelyekben a kromoszómákat a hiszton-RFP vörösen, a mikrotubulusokat a Jupiter-GFP zölden „világította ki”. Az abnormalis centroszómákkal kapcsolatos magokat szaggatott vonal öleli körbe.

8. Olyan transzgéneket készítettünk, amelyek az N-terminusokon CFP-vel jelölt ép, valamint *Horka^D*-kódolt mutáns fehérjék képződését kódolják. És olyanokat is, amelyek a C-terminálisukon RFP-vel jelölt ép, valamint *Horka^D*-kódolt mutáns fehérjék képződését kódolják. [A transzgéneket azért készítettük, mert nincs olyan anti-Lodestar ellenanyag, amely csak a Lodestar (LDS) fehérjét ismerné fel.] Megállapítottuk, hogy a CFP-vel és az RFP-vel jelölt ép Lodestar (LDS) fehérjék funkcióképesek, hisz' kiküszöbölik az *lds* gén funkciójának vesztésével kapcsolatos hiányosságokat. Azok a fehérjék is funkcióképesek, amelyek CFP-vel, illetve RFP-vel jelölt, *Horka^D*-kódolt mutáns fehérjék képződéséért felelősek, hiszen funkciójuk nyomán gүнanderek képződnek.

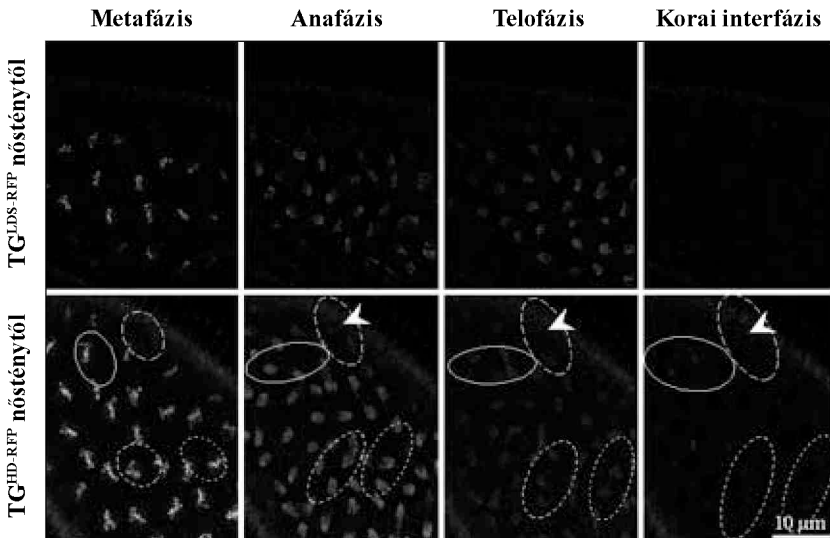


4. **ábra.** A LDS fehérje az interfázisban citoplazmatikus, a prometafázis folyamán jut a sejtmagba, ahol a kromoszómák részévé válik. Az ábra olyan élő embrióról készült optikai metszetet mutat, amelyben a CFP-LDS molekulák kéken fluoreszkálnak, a mikrotubulusok pedig vörös színben tűnnek elő.

9. A konfokális mikroszkópban készített optikai metszetek sorozata megmutatta, hogy az LDS fehérje az interfázisban a citoplazma része, onnan a prometafázis folyamán jut a sejtmagba, ahol a kromoszómák részévé válik. Az LDS fehérje az anafázisban is a kromoszóma része, hogy aztán a telofázis során onnan leváljon, és az interfázis kezdetére

a citoplazmában legyen (4. ábra). A megfigyelések azt jelzik, hogy az LDS fehérjének minden bizonnyal a meta- és az anafázisú kromoszómákkal kapcsolatos funkciója van.

10. A fentiek alapján úgy tűnik, hogy az ép LDS fehérje a kromatin szerkezetének biztosításában, és/vagy a kromoszóma szegregációban van szerepe.



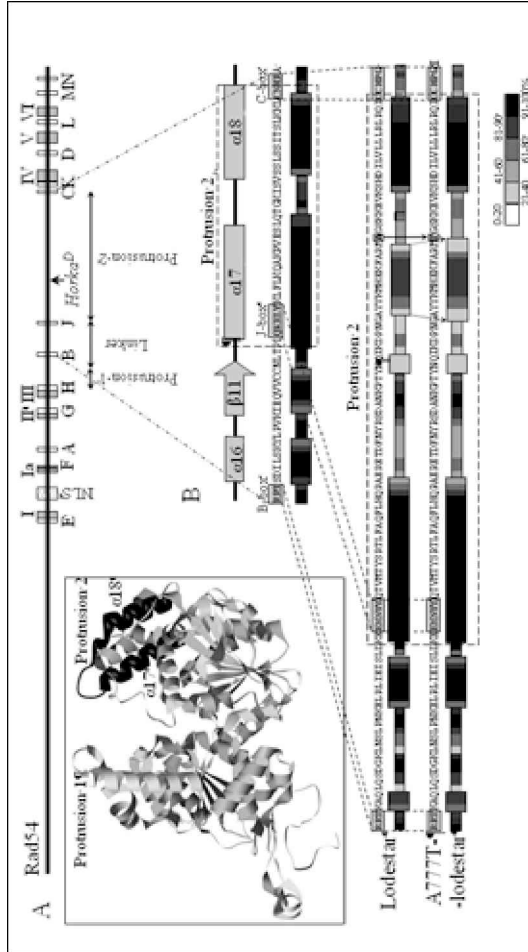
5. ábra. A *Horka^D*-kódolt A777T-LDS molekulák enyhén ragadósak. Azok az LDS-FRP molekulák, amelyek képződését egy *TG^{LDS-RFP}* transzgén kódolja, a meta-, az ana- és a telofázis során „kivilágítják” a kromoszómákat. Csakúgy, mint az A777T-LDS-RFP molekulák, amelyek képződését egy *TG^{LDS-RFP}* transzgén kódolja. A mutáns A777T-LDS-RFP molekulák abnormalis anafázist okoznak, és kivilágítják a *Horka^D*-re jellemző kromoszóma hidakat (←).

11. Kiderítettük, hogy az EMS-el indukált *Horka^D* mutáns allél egyetlen bázispár-csere ($G^{2424} \rightarrow A$) típusú mutáció nyomán képződött. A transzicó következményeként az Ala⁷⁷⁷ helyére Tre kerül az A777T-LDS molekulákban. Az A777T-LDS-FRP molekulák, amint azt az 5. ábra mutatja, enyhén ragadósak tűnnek, és nem válnak le a kromatinról.

KÖVETKEZTETÉSEK

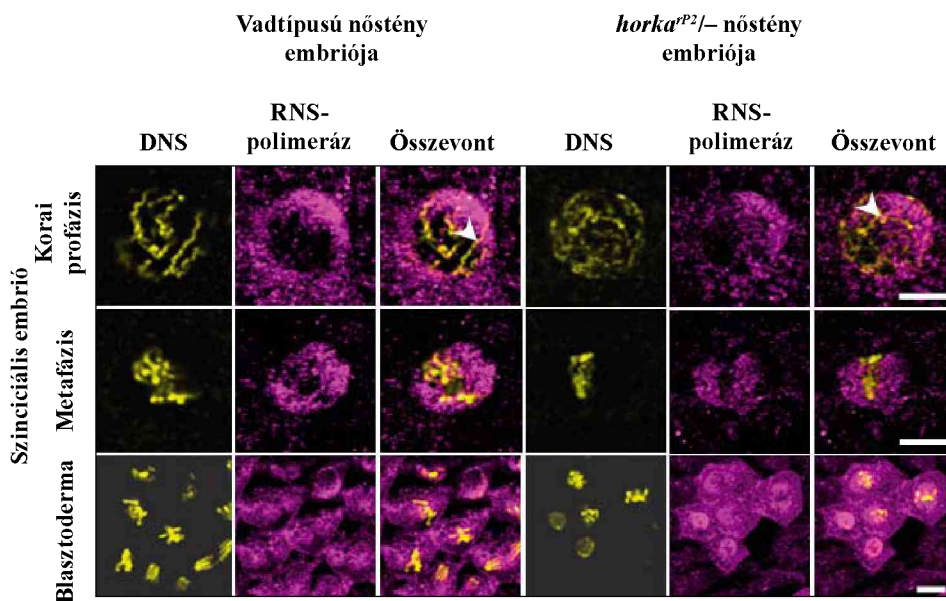
Az LDS fehérje, amely 1061 aminosavból áll, tömege 155 kDa, a helikáz típusú fehérjék Snf2 családjának egyik tagja (Flaus et al. 2006). Az Snf2 család tagjairól leírták, hogy a transzkripció szabályozásában, a DNS reparációjában, a rekombinációban, valamint a kromatin állományának lazításában vesznek rész (Flaus et al. 2006).

A helikáz típusú fehérjékben jellegzetes motívumok vannak, jellegzetes funkcióval (**6. ábra**). A 17. és a 18. α -hélixek, valamint az őket összekötő szakasz az ún. 2. kitüremkedést alkotja, amellyel a helikáz típusú molekula a DNS-sel kölcsönhatásba lép (**6. ábra**; Flaus et al. 2006; Thomas et al. 2005). A *Horka^D*-vel kapcsolatos rendellenességek alapja minden bizonnyal az, hogy az A777T-LDS molekulákban két aminosavval hosszabbá vált a DNS-sel kölcsönhatásba lépő 2. kitüremkedés, amely miatt az A777T-LDS molekulák ragadóssá váltak.



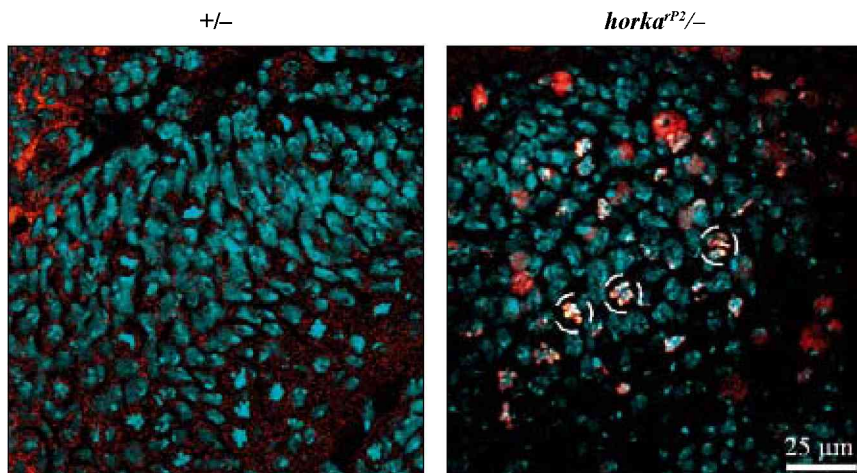
6. ábra. A Rad54 (A, valamint a bekeretezett ábrarész), az LDS és az A777T-LDS egy részének szerkezete. (A) A nukleotid trifoszfát-kötő, ún. helikáz motívumok (I-VI), és az E-N konzervált részek a zebrahal Rad54-jában, az Snf2 helikázok egyik tagjában. (B) A Rad54 molekula bejelölt része képezi azt a 2. kitüremkedést, amely DNS-sel történő kölcsönhatás tényezője. A C box szomszédságában levő KK aminosavak azok, amelyeken át a molekula kapcsolódik a DNS-hez (Thoma et al. 2005). Az LDS fehérjében több aminosavból áll a 2. kitüremkedés, mint a Rad54-ben, és egy α -hélix is alakul benne. A *Horka^D* kódolt A777T-LDS-ben az α -hélix két aminosavval hosszabb, mint az ép LDS fehérjében. A szokottnál két aminosavval hosszabb α -hélix lehet az A777T-LDS molekulák ragadósságának oka. (Az ábra jobb alsó sarkában levő skála annak valószínűségét mutatja, hogy valamely aminosav α -hélix része.

A szakirodalomban fellelhető általános vélekedés szerint az LDS fehérje a TTF2, az ún. transzkripció-termináció-faktor-2 (Liu et al. 1998; Jiang and Price 2004). Ez a vélekedés aligha helytálló, hisz' az RNS-polimeráz mintázat nem különbözik a vad típusú, és a *horka^{rP2}/-* nőtények embrióiban (**7. ábra**). Ha valóban az LDS fehérje lenne a TTF2, az RNS-polimeráznak a kromoszómákon kellene maradnia a *horka^{rP2}/-* nőtények embrióiban.



7. ábra. A DNS és az RNS-polimeráz helyzete vad típusú és *horka^{rP2}/-* nőtények szinciciális és blasztoderma állapotú embrióiban. A DNS-t a Hoechst 33342 jelű festék világította ki (és itt sárgára színezve látszik) az optikai metszeteken. Az RNS-polimerázt egy anti-RNS-polimeráz ellenanyaggal, és az ahhoz kapcsolódó másodlagos ellenanyaggal tettük láthatóvá. A másodlagos ellenanyag fénye itt lilán látszik. Az egy helyre lokalizáló jelek rózsaszínben tűnnek elő (▼). A skála hossza = 10 μ m

Sokkal inkább úgy tűnik, hogy az LDS fehérje abban a folyamatban vesz részt, amely során a metafázis végén a kromatin a tömörből fellazultabb állapotba jut. Ma azt gondoljuk, hogy az LDS fehérje a kromatin fellazításához szükséges. A fellazítás eredményeként a foszfatázok egyike eltávolítja a hiszton-3-Ser10 aminosaváról a foszfát csoportokat. A *horka^{FP2}/-* zigótákban, LDS fehérje hiányában, a kromatin tömör marad, nem férhet hozzá a foszfatáz, nem távolíthatja el a hiszton-3S10-ről a foszfát csoportot, és tömör kromoszómák jutnak az anafázisba (**8. ábra**). Az a tény, hogy anélkül jutnak kromoszómák az anafázisba, hogy a bennük indukált hibák kijavítódna arra enged következtetni, hogy az LDS fehérjének a Meta-/anafázis átmenet szabályozásában is van szerepe, abban a folyamatban, amelynek kulcsfontosságú eleme a „maternal nuclear kinase”, MNK (Takada et al. 2003).



8. ábra. Neuroblasztok a kontroll (+/-), valamint a *horka^{FP2}/-* lárvákban. A lárvákat 2000 Rad-al sugaraztuk be, majd 100 perc múltán kiboncoltuk a ventrális gangliont, amelyben jól vizsgálható neuroblasztok vannak. A DNS-t Hoechst 33342-al, a hiszton-3S10P molekulákat egy anti-H3S10P ellenanyag-gal tettük láthatóvá. A képen a DNS kék, az anti-H3S10P-al kapcsolódott ellenanyag vörös színben tűnik elő. Amíg a kontrollban nincsenek az anafázisban levő sejtek, a *horka^{FP2}/-* neuroblasztokban vannak, és bennük a kromatin erősen kondenzálódott.

Az MNK akkor aktiválódik, amikor a DNS tökéletlenül replikálódik, sérül, a DNS-t genotoxikus hatás éri. Az aktiválódott MNK a centroszóma-hoz, valamint az asztrális és a kinetochor mikrotubulusokhoz kapcsolódik, azokat inaktíválja. Az inaktiváció eredményeként a sérült DNS-t tartalmazó kromoszómák, sejtmagok nem vesznek részt az osztódásban, a pete citoplazma mélyébe süllyednek, ún. mitotikus katasztrófa következik be. Pontosan olyan események, mint a *horka^{rP2}/-* nőtények embrióiban. MNK hiányában, az *mnk/mnk* nőtények petéiben nem működhet az MNK-alapú mechanizmus, a sérült kromoszómák/magvak is részt vehetnek az osztódásban, aminek - magasabbrendűek esetében - súlyos következményei lehetnek (Vakifahmetoglu et al. 2008). És hogy az LDS és az MNK ugyanannak a folyamatnak a résztvevője abból is látszik, hogy az *mnk/mnk; horka^{rP2}/-* nőtényektől bár roppant ritkán, ám származik néhány utód. Úgy tűnik tehát, hogy az LDS fehérje a metafázis végén a „zárt” kromatin „felnyitásában” játszik szerepet. A kérdés pontosabb vizsgálata pillanatnyilag is folyamatban van a Szabad műhelyben.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Ph.D. értekezésem eredményei a következő pontokban foglalhatók össze.

1. Megmutattuk, hogy a *Drosophila Horka^D* mutációjával azonosított génjének fontos szerepe van a kromatin szerveződésében, valamint az osztódásokban.
2. Meghatároztuk a *Horka^D* mutáció helyét, és bizonyítottuk domináns negatív természetét.
3. P-elemmel végzett mutagenézis során a *Horka^D* funkcióvesztéses, *horka^{rp}* revertáns alléljait indukáltuk, izoláltuk.
4. A *horka^{rp}* allélok alapján (i) meghatároztuk a gén pontos helyét, (ii) a funkcióvesztéses mutáns fenotípust, és (iii) molekulárisan klónoztuk a gént. A funkcióvesztéses mutáns fenotípus (mitotikus katasztrófa) arra utal, hogy az ép gén terméke a sejtciklus-szabályozás fontos résztvevője.
5. Megállapítottuk, hogy *Horka^D* és a *horka^{rp}* revertáns alléljai a *lo-destar* gént azonosítják, az Snf2 helikáz-szerű fehérjecsald egyik tagját.

6. Kiderítettük, hogy *Horka^D* egyetlen tranzíció típusú bázispár-csere mutáció révén képződött, és azt is, hogy *Horka^D* A777T-LDS molekulák képződését kódolja. A mutáció az LDS fehérje azon részét érinti, amelyen át a DNS-sel lép kapcsolatba. A mutáció nyomán két aminosavval meghosszabbodott, a DNS-sel kölcsönható α -hélix révén „ragadóssá” vált A777T-LDS molekulák okai minden, a *Horka^D*-vel kapcsolatos rendellenességnek
7. Olyan transzgéneket készítettünk, amelyek CFP-vel, illetve RFP-vel „kivilágított” LDS és A777T-LDS képződését kódolják. A „kivilágított” LDS molekulák és a funkcióvesztéses mutáns fenotípus alapján megállapítottuk, hogy - minden vélekedéssel ellentétben - az LDS nem funkcionálhat, mint transzkripció-termináció-faktor-2.
8. Legújabb eredményeink arra utalnak, hogy az LDS fehérje szerepe kettős. Egyrészt részt vesz abban a folyamatban, amely célja a genom stabilitás megőrzése, másrészt a kromatin lazításában van szerepe a metafázis/anafázis átmenet idején.

IRODALOM

Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Yakushijin, K., Horne D. et al., The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene* **23**, 4353-4361, 2004.

Erdélyi, M. and Szabad, J., Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. I. Mutations on the third chromosome. *Genetics* **122**, 111-127, 1989.

Flaus, A., D. M. Martin, G. J. Barton and T. Owen-Hughes, Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* **34**, 2887-2905, 2006.

Girdham, C. H. and Glover, D. M., Chromosome tangling and breakage at anaphase result from mutations in *lodestar*, a *Drosophila* gene encoding a putative nucleoside triphosphate-binding protein. *Genes Dev* **5**, 1786-1799, 1991.

Jiang Y and Price DH., Rescue of the TTF2 knockdown phenotype with an siRNA-resistant vector. *Cell Cycle* **3**, 1151-1153, 2004.

Liu, M., Xie, Z., Price, D.H., A human RNA polymerase II transcription termination factor is a SWI2/SNF2 family member. *J. Biol. Chem.* **273**, 25541-25544, 1998.

Musacchio, A. and Salmon, E. D., The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393, 2007.

Szabad, J., Erdélyi, M., Hoffmann, Gy., Szidonya, J. and Wright, T.R.F., Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations on the second chromosome. *Genetics* **122**, 823-835, 1989.

Szabad, J., Máthé, E. and Puro, J., *Horka*, a dominant mutation of *Drosophila*, induces nondisjunction and, through paternal effect, chromosome loss and genetic mosaics. *Genetics* **139**, 1585-1599, 1995.

Szalontai, T., Gáspár, I., Belec, I., Kerekes, I., Erdélyi, M., Boros, I. and Szabad, J., *Horka^D*, a chromosome instability causing mutation in *Drosophila*, is a dominant negative allele of *lodestar*. *Genetics*, doi:10.1534/Genetics.108.097345.

Takada, S., Kelkar A. and Theurkauf, W. E., *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* **113**, 87-99, 2003.

Thoma, N. H., B. K. Czyzewski, A. A. Alexeev, A. V. Mazin, S. C. Kowalczykowski et al., Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 350-356, 2005.

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. and Zhivotovsky, B., Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15**, 1153-1162, 2008.

AZ ÉRTEKEZÉS PILLÉRJEKÉNT SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Tudományos dolgozat

Szalontai, Tamás, Gáspár, Imre, Belec, István, Kerekes, Irén, Erdélyi, Miklós, Boros, Imre and Szabad, János, *Horka^D*, a chromosome instability causing mutation in *Drosophila*, is a dominant negative allele of *lodestar*. Genetics, doi:10.1534/Genetics.108.097345. IF = 4,001.

Tudományos népszerűsítő dolgozat

Szalontai Tamás és Szabad János, A helikázok, a nukleinsavakat szétcsavaró fehérjék szerepe a sejtek életében.

Biokémia **26**, 74-83, 2002.

Tudományos konferenciákon elhangzott előadások kivonatai

(Az előadást az első szerző tartotta.)

Szalontai Tamás, Máthé Endre, Penyige András és Szabad János, A *Drosophila Damasa^D* nőtény steril mutációnak genetikai jellemzése. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 1999. április 11-14.

Szalontai Tamás, Belec István és Szabad János, Mi a DNS-helikázok szerepe a sejtek életében?

X. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2002. március 27-29.

Szalontai Tamás, Belec István, Kerekes Irén, Boros Imre és Szabad János, Hogyan okoz a *Drosophila Horka^D* mutációja kromoszómavesztést az utódokban?

VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok. Eger, 2005. április 10-12.

Szalontai Tamás, Beleczi István, Kerekes Irén, Boros Imre és Szabad János, Rejtélyek a muslica egyik helikáza körül.

Genetikai Műhelyek Magyarországon Konferencia

MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged, 2005. szeptember 9.

Szabad J., Szalontai T., Gáspár I., Beleczi I., Which gene codes for transcription-termination-factor-2 (TTF2) in *Drosophila*?

XX. International Congress of Genetics, Berlin, July 12-17, 2008, p. 51

POSZTEREK

Szalontai Tamás, Beleczi István és Szabad János, A *Drosophila Horka* génje azt a DNS-helikázt kódolja, amely a humán Bloom szindróma gén homológja.

A Magyar Biológiai Társaság Sejt- és Fejlődésbiológiai Szekciója

IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 2001. január 21-24.

Tamás Szalontai, István Beleczi, Irén Kerekes, Jaakko Puro, Imre Boros and János Szabad, The *Horka^D* dominant negative mutation of *Drosophila* identifies the *lodestar* gene encoding a putative helicase subunit with nucleoside triphosphate-binding activity.

19th European *Drosophila* Research Conference, August 31-September 3, 2005 Eger, Hungary

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki szakvezetőmnek, Szabad Jánosnak, szakmai útmutatásáért, segítőkész munkájáért. A Horka témán való munkálkodás nem csak életem nagyszerű szakasza volt, hanem a tanulásé, azé az izgatott várakozásé, amely a nyomozásszerű munkánkat körbelengte. Természetesen azok az eredmények, amelyek a Ph.D. dolgozatom alapját adják, csoportmunka gyümölcsei. Különösen hálás vagyok Gáspár Imrének és Szabad Jánosnak a mindennapos beszélgetésekért, a közösen folytatott kísérletekért. Sokak segítségét köszönöm. Nemcsak azért, mert önzetlenül megtanítottak a különféle technikákra, hanem azért is, mert mindig átsegítettek a bizony gyakorta tornyosuló akadályokon: Beleczy István-nak, Erdélyi Miklósnak, és Boros Imrének.

Köszönetemet fejezem ki a Szabad műhely munkatársainak, akikkel csoda kellemes éveket töltöttünk együtt Szegeden: Lippai Mónikának, Tirián Lacinak, Timinszky Gyulának, Sarkadi Zsuzsának, Venkei Zsolt-nak, Ördög Balázsnak és Seprényi Gyurinak. Hálás vagyok az Orvosi Biológiai Intézet technikai személyzetének is, akik családias hangulatot teremtettek: Teleki Gabinak, Kisé Aninak, Kisapátné Margónak, Révész Katinak, Papdi Csillának, Rózsika és Piroska néniknek, és Lajos bácsinak.

A Horka-kutatások a következő forrásokra támaszkodtak: Cell Cycle Network/PECO-66090, az MTA Anyai Hatás és Embriógenézis kutatócsoportja, ETT T9544, FKFP 1348, három OTKA pályázat (T16737, T43158 és NI69180), valamint a Szegedi Tudományegyetem Ph.D. programja.